

# **AVALIAÇÃO DE TRANSFERIBILIDADE DE MICROSSATÉLITES FUNCIONAIS DE SORGO (EST-SSR) VISANDO A CONSTRUÇÃO DE MAPAS DE LIGAÇÃO EM CANA-DE-AÇÚCAR**

FLÁVIA K. **GONÇALVES**<sup>1,2</sup>; THAÍS MONTEIRO **FÁVERO**<sup>2</sup>; LUCIANA R. **PINTO**<sup>2</sup>

Nº 10113

## **RESUMO**

Os Projetos de Seqüenciamento de ESTs (Etiquetas de Seqüências Expressas) de culturas de importância econômica como a cana-de-açúcar e o sorgo têm permitido o desenvolvimento de microssatélites funcionais (EST-SSRs). Por apresentarem uma alta transferibilidade entre espécies correlacionadas, os EST-SSRs têm sido utilizados como marcadores âncoras em estudos de mapeamento comparativo. Este trabalho teve como objetivo identificar EST-SSRs de sorgo que apresentam altas taxas de transferibilidade e que sejam adequados para gerar marcadores em dose única em uma população de mapeamento genético de cana-de-açúcar do Programa Cana IAC. Dos 13 EST-SSRs avaliados, 10 geraram produtos de amplificação capazes de serem genotipados produzindo um total de 59 alelos (marcas) com uma média de 4,5 alelos por loco. O número de alelos por EST-SSRs variou de 1 a 10 com valores de PIC entre 0.294 e 0.842. Os 3 EST-SSRs de sorgo que foram amplificados na população de mapeamento produziram 17 alelos, dos quais 5 (30%) encontraram-se em dose única. A transferibilidade de EST-SSRs de sorgo em cana de açúcar mostrou-se viável, entretanto requer a avaliação de um número maior de EST-SSRs quando o objetivo é o mapeamento bi-parental.

## **ABSTRACT**

The EST sequencing projects of major cash crops such as sugarcane and sorghum have allowed the development of microsatellites (EST-SSRs). As EST-SSRs have a high transferability rate among correlated species, they have been used as anchor markers in comparative mapping studies. The present work aimed to identify sorghum EST-SSRs with high

---

<sup>1</sup> Bolsista CNPq: Graduando em Ciências Biológicas, Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto-SP, email: [flavinhakg@ig.com.br](mailto:flavinhakg@ig.com.br)

<sup>2</sup>Orientador: Pesquisadora: Centro de Cana-IAC, Ribeirão Preto-SP.

transferability rate and that can be used to produce single dose markers in a sugarcane mapping population of the IAC Sugarcane Breeding Program. Of the 13 EST-SSRs evaluated, 10 were able to be amplified and scored producing 59 alleles (markers) with an average of 4.5 alleles per locus. The number of alleles ranged from 1 to 10 with PIC values between 0.294 and 0.842. The 3 sorghum EST-SSRs that were amplified in the mapping population produced 17 alleles, of which, 5 (30%) were single dose markers. The transferability of sorghum EST-SSRs to sugarcane was feasible, however, needs the evaluation of several EST-SSRs when the objective is the bi-parental mapping.

## INTRODUÇÃO

Os Projetos de Sequenciamento das Etiquetas de Seqüências Expressas (ESTs) de culturas de importância, tais como a cana-de-açúcar (<http://sucest.lad.dcc.unicamp.br/en/>), arroz (<http://redb.ncpgr.cn/>) e sorgo (<http://csgr.agtec.uga.edu/>) têm permitido o desenvolvimento de microssatélites de forma rápida e econômica pela simples mineração de seqüências repetitivas nos bancos de dados. Tais microssatélites por derivarem de ESTs são considerados de grande utilidade para acessar a diversidade ao nível de genes expressos em coleções de germoplasma e também no mapeamento genético, visto que o polimorfismo gerado permite o mapeamento direto de genes expressos, os quais podem proporcionar a identificação de marcadores associados a características de interesse. Os EST-SSR por representarem parte de um gene transcrito, amplificam regiões conservadas do genoma e, portanto, apresentam uma maior transferibilidade entre espécies correlacionadas sendo utilizados como marcadores âncoras no mapeamento comparativo.

A utilização do genoma pequeno do sorgo, como referência, em estudos de mapeamento comparativo, tem contribuído para acelerar a análise do genoma da cana-de-açúcar, principalmente, em relação à detecção de QTLs (locos de características quantitativas) relacionados à resistência a doenças (MCINTYRE et al., 2005) e parâmetros agroindustriais (JORDAN et al., 2004) obtidos através de marcadores provenientes de sondas heterólogas em ensaios de RFLP (*Restriction fragment lenght polymorphism*).

Neste contexto, a presente pesquisa tem como proposta identificar EST-SSRs de sorgo que apresentam altas taxas de transferibilidade em cana-de-açúcar e que sejam adequados para gerar marcadores em dose única em uma população de mapeamento genético de cana-de-açúcar do Programa Cana IAC.

## MATERIAL E MÉTODOS

A transferibilidade dos EST-SSRs de sorgo em cana-de-açúcar foi avaliada em 13

acessos representativos do gênero *Saccharum* sp. incluindo genitores de populações de mapeamento genético disponíveis na literatura e ainda uma linhagem de sorgo como controle, os quais tiveram o seu DNA genômico extraído conforme metodologia descrita por (HOISINGTON et al., 1994) com algumas modificações para cana-de-açúcar. O DNA de cada indivíduo foi quantificado na presença de um padrão de DNA do fago lambda de quantidades conhecidas em gel de agarose 0.8% (p/v) corado com brometo de etídio. Os EST-SSRs transferidos tiveram as suas temperaturas de anelamento re-ajustadas (48-60°C) em um termociclador com gradiente de temperatura (My-Cycler, Bio-rad). As reações de PCR foram efetuadas conforme descrito (WANG et al., 2005). As amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante a 5% utilizando ladder de 10 bp como marcador de peso molecular. As bandas foram reveladas pela coloração com prata de acordo com o protocolo estabelecido por CRESTE et al. (2001) e genotipadas de acordo com sua presença (1) ou sua ausência (0). Foram avaliados 13 EST-SSRs de sorgo obtidos por WANG et al. (2005) (Tabela 1).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 13 EST-SSRs avaliados, 10 geraram produtos de amplificação capazes de serem genotipados produzindo um total de 59 alelos (marcas) com uma média de 4,5 alelos por loco, sendo que destes, 52 segregaram em pelo menos um dos indivíduos, o que corresponde a 88% do total de marcas amplificadas. O número de alelos por EST-SSRs variou de 1 (CF756750) a 10 (CN131982 e CN131954) com valores de PIC entre 0.294 (CN125375) e 0.842 (CN131954) (Tabela 1) os quais encontram-se dentro dos valores relatados em estudos de transferibilidade de estreitamente relacionados como *Erianthus* e *Sorgo* spp. (CORDEIRO et al 2001). A transferibilidade dos marcadores depende do grau de parentesco genético das espécies analisadas desde a diferença do seqüenciamento de DNA, o tamanho do genoma e as condições de PCR. A taxa de transferibilidade encontrada no presente estudo foi de 25% e pode ser considerada média se comparada com as taxas de transferibilidade de milho para sorgo (61%) e de milho para trigo (44%) reportadas por WANG et al (2005).

**TABELA 1:** Relação dos EST-SSRs quanto ao tamanho esperado (TE), amplitude dos alelos observados em pares de bases (pb) e respectivo número de alelos e valores de conteúdo de informação de polimorfismo (PIC).

EST-SSRs	TE (pb)	Amplitude (pb)	Nº alelos	PIC
AW282451	371	310-350	6	0.616
AW564647	378	-	-	-
CF483325	366	-	-	-
CF485570	377	-	-	-
CF488525	166	160-180	3	0.395
CF489413	221	190-220	3	0.470
CF755893	290	210-260	9	0.770
CF756750	236	240	1	0.000
CN125375	340	*	3	0.294
CN131982	302	*	10	0.810
CN131954	324	*	10	0.842
CNL 170	206	180-210	9	0.823
CF488561	300	280-300	5	0.584
Total			59	

(-) EST-SSRs não genotipados; (\*) Valores não mensurados.

Três EST-SSRs de sorgo que apresentaram transferibilidade em cana-de-açúcar foram amplificados nos indivíduos da população de mapeamento composta por 200 indivíduos oriundos do cruzamento bi-parental IACSP95-3018 vs IACSP93-3046 (Figura 01). Dos 17 marcadores polimórficos obtidos com a amplificação destes 3 EST-SSRs, 5 (29,41%) foram encontrados no genitor feminino (IACSP95-3018), 5 (29,41%) no genitor masculino (IACSP93-3046) e 7 (41,17%) em ambos os genitores. Após o teste de qui-quadrado, 5 (29,41%) marcadores apresentaram desvios de segregação não significativos ao nível de 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ), podendo ser assumidos como marcadores em dose única. Tais marcadores serão futuramente incorporados no mapa de ligação oriundo do cruzamento IACSP95-3018 x IACSP93-3046.

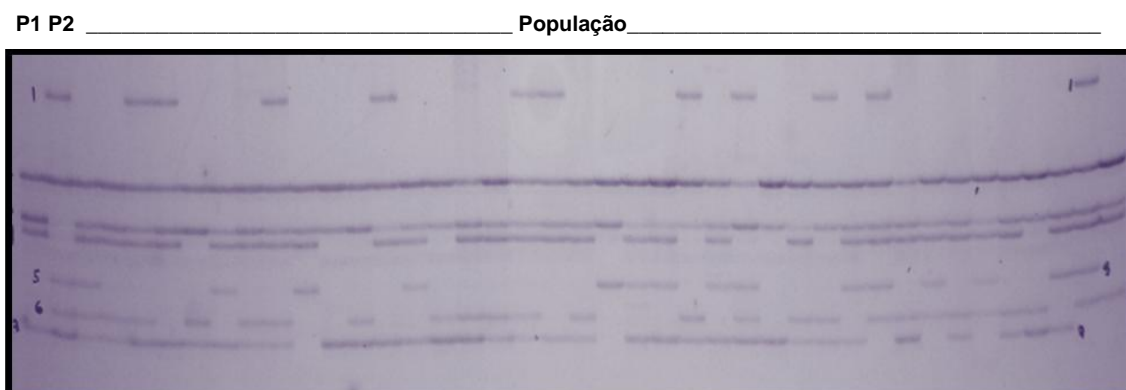


FIGURA 1. Padrão de amplificação do EST-SSRs (CN131982) em gel de poliacrilamida (5%) corado com prata em uma amostra de indivíduos da população de mapeamento. P1(IACSP95-3018) e P2 (IACSP93-3046).

## CONCLUSÃO

A transferibilidade de EST-SSRs de sorgo em cana de açúcar é viável, porém requer a avaliação de um número considerável de EST-SSRs quando o objetivo é o mapeamento bi-parental. Porém, o nível satisfatório de polimorfismo observado entre os 19 acessos avaliados sugere que os mesmos poderão ser utilizados em trabalhos de mapeamento associativo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cordeiro GM, Casu R, McIntyre CL, Manners JM and Henry RJ (2001) Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to *erianthus* and sorghum. *Plant Science* 160: 1115–1123.
- Hoisington, D., Khairallah, M., González-De-León, D. **Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory**. Mexico: DF, 1994. 51p.
- Jordan, D.R., Casu, R.E., Besse, P., Carroll, B.C., Berding, N., McIntyre, C.L. Markers associated with stalk number and suckering in sugarcane colocate with tillering and rhizomatousness QTLs in sorghum. *Genome*, v.47, p.988–993, 2004.

- McIntyre CL, Casu RE, Drenth J, Knight D, Whan VA, Croft B, Manners JM. Resistance Gene Analogues in Sugarcane and Sorghum and their Association with QTLs for Rust Resistance. *Genome*, v 48,p.391-400,2005.
- Wang, M. L., Barkley, N. A., Yu, J.-K., Dean, R. E., Newman, M. L., Sorrells, M. E., Pederson, G. A. Transfer of simple sequence repeat (SSR) markers from major cereal crops to minor grass species for germplasm characterization and evaluation. *Plant Genetic Resources*, v.3, p.45–57, 2005.
- Zhi-Ben,Y., Sun, Y., Xiao-Hong, L., Wei-Jun,Z., Min, Y., Li-Xia, C. Advances in genetic mapping of the sorghum genome. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*, v.3, p.155–161, 2006.